ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202003.00023v1

基于 ISSR 分子标记的叶子花亲缘关系分析和指纹图谱构建

孙利娜[1]，李进华[1]，甘四明[1,2]，唐庆[1]，李冰[1]，刘雁玲[1]，马坚炜[1]，廖美兰[1]，黄欣[1]，林茂[1]*

(1. 广西壮族自治区林业科学研究院, 广西优良用材林资源培育重点实验室, 中南速生材繁育国家林业局重点实验室, 南宁, 530002; 2.中国林业科学研究院热带林业研究所, 热带林业研究国家林业局重点实验室, 广州, 510520)

摘要：该研究从 DNA 模板浓度、引物浓度、退火温度和循环次数等方面优化了叶子花 ISSR-PCR 反应体系和反应程序，利用 11 个 ISSR 引物对 131 个叶子花品种进行 PCR 扩增，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测，分析品种遗传多样性和遗传距离，并构建品种聚类图和指纹图谱。结果表明，优化的 ISSR-PCR 反应体系中 DNA 模板浓度为 0.5 ng・μL^{-1}，引物浓度为 0.5 μM・L^{-1}，引物 UBC813、UBC814、UBC815、UBC823、UBC824、UBC835、UBC840、UBC841、UBC843、UBC844 和 UBC876 的最佳退火温度分别为 52.3、55.9、54.3、54.3、53.6、56.2、56.2、51.9、54.4、54、50 ℃，循环次数为 32。用 11 个 ISSR 引物对 131 个叶子花品种扩增出 161 条带，其中多态性条带 156 条，多态性比率为 96.89%。单个引物的等位基因数、有效等位基因数、*Nei's* 基因多样性指数和 *Shannon's* 信息指数分别为 1.86~2.00、1.33~1.68、0.21~0.39 和 0.34~0.57，平均值分别为 1.969、1.478、0.294 和 0.447。引物 UBC841 的鉴别率最高(80.92%)，可有效鉴别 106 个品种，再与引物 UBC876 结合可将 131 个叶子花品种完全鉴别开，建立了各品种的指纹图谱。叶子花品种的遗传距离范围为 0.00~0.60，平均值 0.365，遗传多样性较低，在遗传距离 0.58 处，131 个品种分为 6 大类群，聚类分析表明同一个种的品种大多数聚在一类，但同一个种仍有品种未聚在一类或亚类、也有多个种的品种聚在一类。该研究较为准确的揭示了叶子花种质资源的遗传多样性，建立的指纹图谱为叶子花品种登记、知识产权保护以及品种鉴定提供了可靠技术和有效手段。

关键词：叶子花，ISSR 标记，遗传多样性，亲缘关系，指纹图谱

Analysis of genetic relationship and construction of fingerprints in *Bougainvillea* based on ISSR molecular marker

SUN Lina[1], LI Jinhua[1], GAN Siming[1,2*], TANG Qing[1], LI Bing[1], LIU Yanling[1], MA Jianwei[1], LIAO Meilan[1], HUANG Xin[1], LIN Mao[1*]

(1. *Guangxi Key Laboratory of Superior Timber Trees Resource Cultivation & Key Laboratory of Central South Fast-growing Timber Cultivation of Forestry Ministry of China, Guangxi Forestry Research Institute*, Nanning 530002, China; 2. *Key Laboratory of State Forestry Administration on Tropical Forestry Research, Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry*, Guangzhou 510520, China)

基金项目：广西科技计划项目(桂科 AD17129021)；“广西主要用材林资源高效培育与利用人才小高地”专项(桂财社函[2018]112 号) [Supported by the Program of Guangxi Science and Technology Program(guikeAD17129021); Department of Human Resources and Social Security of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China (GuiCaiSheHan[2018]112)]。

作者简介：孙利娜，女，博士研究生，工程师，主要从事园林植物遗传育种研究，（E-mail）sunlina8958170@126.com。

*通信作者：林茂，高级工程师，主要从事园林植物遗传育种工作，（E-mail）49888178@qq.com。

Abstact: In this study, ISSR-PCR reaction system was optimized from DNA template concentration, primer concentration, annealing temperature and cycle times, a total of 11 ISSR markers were used to amplify DNA samples of the 131 *Bougainvillea* cultivars, and the ISSR amplicons were detected based on a agarose gel electrophoresis method. Cultivars genetic diversity was analysed,and their genetic distance was calculated, Moreover, the clustering analysis and fingerprint construction were performed for all the cultivars. The results showed that DNA template concentration was 0.5ng・μL^{-1}, primer concentration was 0.5μm・L^{-1}, and the optimal annealing temperature of primers UBC813, UBC814, UBC815, UBC823, UBC824, UBC835, UBC840, UBC841, UBC843, UBC844 and UBC876 were 52.3℃, 55.9℃, 54.3℃, 54.3℃, 53.6℃, 56.2℃, 51.9℃, 54.4℃, 54℃ and 50℃, respectively, the number of rings was 32. Totally 161 bands were generated collectively by the 11 ISSR primers, and the 156 bands were polymorphic, the polymorphic ratio was 96.89%. Allele number, effective allele number, *Nei's* gene diversity index and *Shannon's* information index ranged from 1.86 to 2.00, 1.33 to 1.68, 0.21 to 0.39 and 0.34 to 0.57, with an average of 1.969, 1.478, 0.294 and 0.447 per primer, respectively. Primer UBC841 had the highest identification rate(80.92%), 106 cultivars were identified by it. 131 cultivars were completely identified and their molecular fingerprints were constructed based on combination of UBC841 and UBC876. The genetic distance between 131 cultivars ranged from 0.00 to 0.60, with an average of 0.365, genetic diversity of 131 *Bougainvillea* cultivars was low, they were divided into 6 groups at 0.58 genetic distance. Clustering analysis indicates that majority of the cultivars within a species tend to fall in the same cluster, but some cultivars of the same species were grouped in different clusters or sub-clusters and certain cultivars from different species grouped in the same cluster. Genetic diversity of *Bougainvillea* germplasm resources was revealed accurately, the ISSR-based fingerprints of *Bougainvillea* cultivar provide reliable technique for cultivar registration and intellectual property protection as well as cultivar clarification in production practices.

Key words: *Bougainvillea*, ISSR marker, genitic diversity, genetic relationship, fingerprints

叶子花（*Bougainvillea spectabilis* Willd.）属于瑞香目（Thymelaeceae）紫茉莉科（Nyctaginaceae）叶子花属（*Bougainvillea*）植物，在热带和亚热带地区常用于园林绿化，在我国的栽培历史有 100 多年。叶子花品种繁多，芽变类型丰富，我国引种选育的大约有 200 个品种，但它们的遗传关系不明确，并且存在同物异名和同名异物现象。目前，关于叶子花的研究多集中在繁殖栽培（周群，2008；Moneruzzaman et al，2010；孙利娜等，2017）和理化研究方面（赵家昱等，2014；Figueroa et al，2014；Marana et al，2015；Chauhan et al，2016），关于遗传多样性方面的研究不多，尤其是基于内部简单重复序列（Inter-Simple Sequence Repeats, ISSR）分子标记技术分析叶子花种质资源亲缘关系的研究，目前仅有 1 篇报道，并且分析的品种只有 68 个（李房英等，2011），品种数量较少。利用 ISSR 分子标记鉴定大批量叶子花品种、构建叶子花品种指纹图谱的研究还未见报道。

ISSR 分子标记技术是在简单重复序列（Simple Sequence Repeats, SSR）标记基础上建立起来的，在简单重复序列的一端加 1~4 个碱基设计引物，检测两个距离较近、方向相反的 SSR 之间的 DNA 序列多态性，原理与 SSR 相似（邵珠田，2017；周兰英，2014）。ISSR 标记引物设计简单，多态性高于随机扩增多态性 DNA 标记（Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD）和限制性内

chinaXiv:202003.00023v1

chinaXiv:202003.00023v1

切酶片段长度多态性（Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP），易操作、所需 DNA 少、稳定性强、重复性好、成本低且安全性高（谭华强，2014）。目前，ISSR 标记已广泛应用到亲缘关系分析(李国帅，2014)、遗传多样性分析（王琳，2015；梁颖，2018）、指纹图谱构建（王璐静，2016）、品种鉴别（Ali，2015；Jedrzejczyk et al，2018；孙利娜等，2017）、纯度鉴定（管洁等，2013）、遗传稳定性分析（Reza et al，2017）等领域。本研究以 131 个叶子花品种为研究对象，利用 ISSR 标记分析它们的遗传多样性，确定它们的亲缘关系，并进行品种鉴定和指纹图谱构建，从而为叶子花种质资源保存、知识产权保护以及品种鉴定提供了可靠技术和有效手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

参试的 131 个叶子花品种见表 1，其中 18 个品种（序号 1-18）保存于广西壮族自治区林业科学研究院园林花卉所，113 个品种（序号 19-131）采自中国热带农业科学院热带作物品质资源研究所。从生长健壮、无病虫害的植株上采集幼嫩叶片，迅速提取 DNA，冷冻于-80℃冰箱备用。

表 1 参试的 131 个叶子花品种

Table 1 The 131 *Bougainvillea* cultivars tested in this study

品种序号 Cultivar no.	品种 Cultivar	品种序号 Cultivar no.	品种 Cultivar
1	青叶紫(小叶浅紫) (*B. glabra* ‘Elizabeth Angus’)	29	柳叶白(*B. glabra* ‘Shweta’)
2	粉粧(*B. glabra* ‘Eva’)	30	绿叶浅紫(*B. glabra* ‘Mrs. Eva’)
3	黄金叶(*B. glabra* ‘Golden Lady’)	31	塔红(*B. glabra* ‘Pink Pixie’)
4	茄色(*B. glabra* ‘Merial Fitzpartick’)	32	小叶紫(*B. glabra* ‘Royal Purple’)
5	塔紫(*B. glabra* ‘Pink Pixie’)	33	新加坡白(*B. glabra* ‘Singapore White’)
6	水红(*B. glabra* ‘Rosa’)	34	新加坡粉(*B. glabra* ‘Singapore Beauty’)
7	光叶斑叶紫花(*B. glabra* ‘Variegata’)	35	雪紫(*B. glabra* ‘Snow Purple’)
8	橙红(*B. spectabilis* ‘Auratus’)	36	牙买加白(*B. glabra* ‘Jamaica White’)
9	胭脂红(*B. spectabilis* ‘China Beauty’)	37	胭脂红(*B. glabra* ‘Zinia Barat’)
10	大花深红(*B. spectabilis* ‘Crimonlake’)	38	银边叶白(*B. glabra* ‘Mrs. Eva Variegata White’)
11	大花深紫(*B. spectabilis* ‘Senjakala’)	39	银河(*B. glabra* ‘Galaxy’)
12	樱花(*B.* × *spectoglabra* ‘Imperial Delight’)	40	紫蝶(*B. glabra* ‘Mrs. Eva Purple Ratana’)
13	金心(*B.* × *spectoglabra* ‘Thimma’)	41	紫丁香美女(*B. glabra* ‘Lilac Beauty’)
14	皱叶深红(*B.* × *buttiana* ‘Barbara Karst’)	42	暗斑叶橙(*B.* × *buttiana* ‘Jinda Orange’)
15	暗斑叶橙红(*B.* × *buttiana* ‘Lateritia’)	43	暗斑叶红(*B.* × *buttiana* ‘Juanita Hatten’)
16	柠檬黄(*B.* × *buttiana* ‘Mrs McLean’)	44	巴特夫人(*B.* × *buttiana* ‘Mrs. Butt’)
17	重瓣大红(*B.* × *buttiana* ‘Pretoria’)	45	斑叶小叶紫(*B.* × *buttiana* ‘Sanderiana Variegata’)
18	斑叶塔紫(*B.* × *buttiana* ‘Temple Fire’)	46	宝花橙(*B.* × *buttiana* ‘Louise Wathen’)
19	福摩斯(*B. glabra* ‘Formosa’)	47	彩虹黄(*B.* × *buttiana* ‘Yellow Wonder’)
20	安格斯(*B. glabra* ‘Elizabeth Angus’)	48	橙冰(*B.* × *buttiana* ‘Louise Wathen Variegata’)
21	暗斑叶白(*B. glabra* ‘Bambino Beesnees’)	49	红粉佳人(*B.* × *buttiana* ‘Alick Lancaste’)
22	白雪公主(*B. glabra* ‘Alba’)	50	加州黄金(*B.* × *buttiana* ‘California Gold’)
23	斑叶怡锦(*B. glabra* ‘Mrs. Eusenia Raja Singhe’)	51	金边叶重粉(*B.* × *buttiana* ‘Los Banos Variegata’)

品种序号 Cultivar no.	品种 Cultivar	品种序号 Cultivar no.	品种 Cultivar
24	光叶紫(*B. glabra* 'Sanderiana')	52	金发女郎(*B.* × *buttiana* 'Blondie')
25	金边安格斯(*B. glabra* 'Elizabeth Angus Variegata')	53	蓝月亮(*B.* × *buttiana* 'Blue Moon')
26	金边叶浅紫(*B. glabra* 'Mrs. Eva Variegata Mauve II')	54	绿叶橙(*B.* × *buttiana* 'Afterglow')
27	金叶白(*B. glabra* 'JinYu')	55	绿叶柠檬黄(*B.* × *buttiana* 'Golden Glow')
28	哭泣的美人(*B. glabra* 'Variegata')	56	水红(*B.* × *buttiana* 'Miss Manila')
57	香港丽人(*B.* × *buttiana* 'Hong Kong Beauty')	95	孟加拉红(*B.* sp. 'Royal Bengal Red')
58	小花大红(*B.* × *buttiana* 'Mrs. Butt')	96	热带花(*B.* sp. 'Tropical Bouquet')
59	猩红皇后(*B.* × *buttiana* 'San Diego Red')	97	塔黄(*B.* sp. 'Pixie Yellow')
60	怡锦(*B.* × *buttiana* 'Cherry Blossom')	98	蜥蜴橙(*B.* sp. 'Lguana Variegata')
61	印度画报(*B.* × *buttiana* 'Chitra')	99	小粉雀(*B.* sp. 'Firecracker Purple')
62	重斑粉(*B.* × *buttiana* 'Los Banos Beauty')	100	小金雀(*B.* sp. 'Firecracker Yellow')
63	重瓣橙(*B.* × *buttiana* 'Roseville's Delight')	101	银边叶浅紫(*B.* sp. 'Pixie Orange')
64	重瓣红(*B.* × *buttiana* 'Mahara')	102	暗斑叶加州黄金(*B.* sp.)
65	重瓣黄(*B.* × *buttiana* 'Aussie Gold')	103	冰斑美人(*B.* sp.)
66	重瓣枣红(*B.* × *buttiana*)	104	波依斯玫瑰(*B.* sp.)
67	重瓣白(*B.* × *buttiana*)	105	大蜜叶精灵(*B.* sp.)
68	帕塔(*B. peruviana* 'Partha')	106	红宝石(*B.* sp.)
69	斑叶印度橙粉(*B. peruviana* 'Partha Variegata')	107	红粉夫人(*B.* sp.)
70	红心樱花(*B. peruviana* 'Makris')	108	红九月(*B.* sp.)
71	金双色(*B. peruviana* 'Thimma')	109	红叶大红(*B.* sp.)
72	口红(*B. peruviana* 'Begum Sikander')	110	金边小叶紫(*B.* sp.)
73	绿叶宫粉(*B. peruviana* 'Mrs. H.C. Buck')	111	金龟紫(*B.* sp.)
74	蒙娜丽莎(*B. peruviana* 'Mona Lisa')	112	金叶浅粉(*B.* sp.)
75	洋红公主(*B. peruviana* 'Mrs. H.C. Buck')	113	拉菲泰(*B.* sp.)
76	印度橙粉(*B. peruviana* 'Partha')	114	绿叶浅黄(*B.* sp.)
77	樱花(*B. peruviana* 'Imperial Delight')	115	浅色樱花(*B.* sp.)
78	火焰(*B. spectabilis* 'Flame')	116	仨斑叶紫(*B.* sp.)
79	毛叶(*B. spectabilis* 'Splendens')	117	洒金叶橙(*B.* sp.)
80	玫红(*B. spectabilis* 'B.J.F. Bailey')	118	沙瓣叶艳红(*B.* sp.)
81	热火桑巴(*B. spectabilis* 'Flame')	119	沙瓣叶紫(*B.* sp.)
82	小红雀(*B. spectabilis* 'Tomato Red')	120	莎莎(*B.* sp.)
83	婴儿玫瑰(*B. spectabilis* 'Baby Rose')	121	索菲亚(*B.* sp.)
84	砖红(*B. spectabilis* 'Lateritia')	122	顽皮(*B.* sp.)
85	暗斑叶樱花(*B.* sp. 'Blushing Beauty')	123	小花粉紫(绿叶) (*B.* sp.)
86	斑叶塔橙(*B.* sp. 'Pixie Orange Variegata')	124	小叶小红粉(*B.* sp.)
87	橙灯笼(*B.* sp. 'Chinese Lantern')	125	异叶红(*B.* sp.)
88	橙蝶(*B.* sp. 'Ratana Orange')	126	银河(*B.* sp.)
89	粉蝶(*B.* sp. 'Feathery Fantasy Double Colour')	127	银沙丽人(*B.* sp.)
90	红蝶(*B.* sp. 'Ratana Pink')	128	杂斑叶大红(*B.* sp.)
91	红莲花(*B.* sp. 'Red Lotus')	129	杂斑叶水红(*B.* sp.)
92	黄金大奖(*B.* sp. 'MonSam')	130	紫叶布丁(*B.* sp.)
93	绿叶玉宝(*B.* sp. 'Ladybird')	131	总统紫(*B.* sp.)

chinaXiv:202003.00023v1

品种序号 Cultivar no.	品种 Cultivar	品种序号 Cultivar no.	品种 Cultivar
94	蒙娜丽莎黄(*B.* sp. ‘Mona Lisa Yellow’)		

注: *B. glabra*: 光叶叶子花; *B.* × *buttiana*: 巴特叶子花; *B. spectabilis*: 毛叶叶子花; *B.* × *spectoglabra*: 光叶×毛叶杂交叶子花; *B. peruviana*: 秘鲁叶子花。

Note: *B. glabra*: *Bougainvillea glabra*; *B.×buttiana*: *Bougainvillea×buttiana*; *B.×spectoglabra*: *Bougainvillea× spectoglabra*; *B. peruviana*: *Bougainvillea peruviana*

1.1.2 引物的合成与筛选

本试验采用的引物序列来自加拿大哥伦比亚大学公布的 100 个 ISSR 引物，由苏州金唯智生物科技有限公司合成，从中筛选出多态性高、稳定性强、重复性好的引物用于叶子花品种的亲缘关系分析和指纹图谱构建。

1.2 试验方法

1.2.1 叶子花基因组 DNA 提取与检测

采用快捷型植物基因组 DNA 提取试剂盒（北京艾德莱生物科技有限公司）提取幼嫩叶片的 DNA，用 1.2%琼脂糖凝胶电泳与紫外分光光度计检测 DNA 浓度。

1.2.2 叶子花 ISSR-PCR 反应体系的优化

参考相关文献（李房英等， 2010），将该实验的原初扩增反应体系定为 20 μL，包括：2x Drem Taq mix 10 μL、ISSR Primer（10 uM）1 μL、RNase-free water 8 μL、20 ng~30 ng Template gDNA 1 μL。然后，对影响 DNA 扩增的重要因素如模板 DNA 浓度（模板 DNA 为橙红品种（*Bougainvillea spectabilis* ‘Auratus’））和所用引物浓度设置梯度，模板 DNA 设 400、200、50、20、10、5、0.2 ng •μL^{-1} 共 7 个浓度，引物设 40、20、15、10、4、2 pmol • μL^{-1} 6 个浓度，利用初筛获得的扩增效果较好的引物 UBC815 进行最优条件的筛选，以期获得最佳反应体系。

PCR 扩增反应在深圳珠海黑马公司生产的 HeMa9600 基因扩增仪上进行，PCR 最初扩增程序为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，52 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 2 min，38 个循环，最后 4 ℃保存。在此基础上，对筛选出的 11 个引物设置退火温度试验、对循环数进行梯度设置（20 个循环、23 个循环、26 个循环、29 个循环、32 个循环、35 个循环、38 个循环、42 个循环）。

PCR 产物使用 1.5%琼脂糖胶检测，Goldview 染色，在电压不超过 5 V/cm 的电场强度下，1×TAE 缓冲液中电泳 90 min，JS-1075 凝胶成像系统上观察成像。

1.2.3 ISSR-PCR 反应体系验证

以供试的其中任意 18 个叶子花品种的 DNA 为模版，用筛选出的多态性好的 ISSR 引物在最佳反应体系及扩增程序下进行 PCR 扩增，检验反应体系的稳定性。

1.2.4 叶子花种质资源 ISSR 扩增数据处理与分析

对扩增产物进行人工读带，以片段大小为 5 000 bp 的 Marker 为标准，统计重复性好、清晰明亮的条带，有条带出现的位点记为 “1”，无条带出现或模糊不清的位点记为“0”。将读取的条带信息转化为 0、1 数据矩阵，利用 PopGene32 软件对供试材料的多态性位点百分率（Percentage of

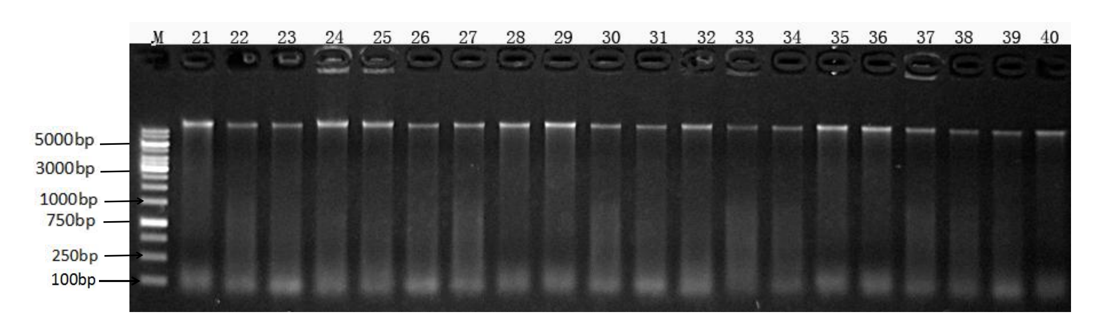
chinaXiv:202003.00023v1

Polymorphic Loci, *PPL*）、观测等位基因数（Observation of Allele Number, *Na*）、有效等位基因数（Number of Effective Alleles, *Ne*）、*Nei's* 基因多样性指数（Gene Diversity Index, *H*）、*Shannon's* 信息指数（Shannon's Information Index, *I*）、遗传距离（Genetic Distance, *GD*）及遗传相似系数（Coefficient of Genetic Similarity, *GS*）等遗传参数进行分析，并基于遗传距离和遗传相似系数在软件 NTSYSpc 2.1（Rohlf et al., 2000）中采用非加权分组算术平均（Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA）法对品种聚类分析，建立叶子花品种的 DNA 数字指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取与检测

利用快捷型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取的叶子花基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测，条带清晰、明亮、无拖尾、样孔内无杂质（图 1 显示了 20 个样品 DNA 的电泳检测结果）。利用紫外分光光度计测定所提 DNA 样品的 OD260/OD280 值，结果 OD260/OD280 值都在 1.8~2.0 之间，浓度在 200~400 ng・μL^{-1}。以上结果说明本研究采用的 DNA 提取法提取的叶子花 DNA 效果好，可用于后续试验。



注: **M(Marker).** 100-5 000 bp 标准分子量参照物，下同; 样品编号为 21-40。

Note: **M(Marker).** 100-5 000 bp molecular marker, the same below; Sample numbers are 21-40.

图 1　20 个叶子花品种 DNA 电泳凝胶图

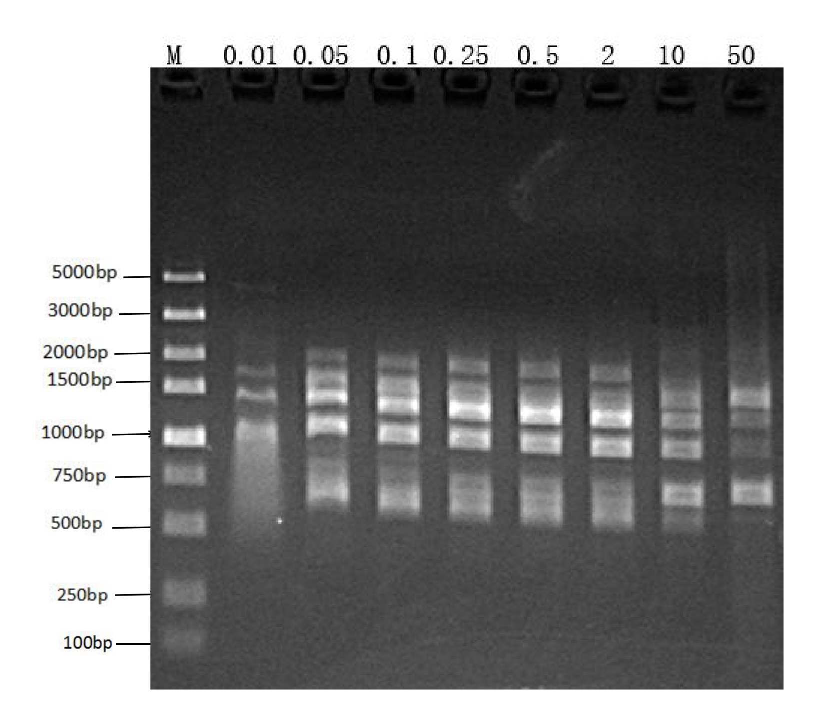
Fig. 1　DNA gel electrophoresis map of 20 *Bougainvillea* cultivars

2.2 叶子花 ISSR-PCR 反应体系的优化

2.2.1 DNA 模板对 PCR 反应的影响

DNA 模板浓度和质量是影响 ISSR-PCR 扩增效果的重要因素，本实验利用引物 UBC815 扩增 DNA 模板，扩增产物(图 2)表明：模板浓度在 0.01~50 ng・ μL^{-1} 范围内均能扩增出条带，但在 0.01 ng・ μL^{-1}、0.05 ng・ μL^{-1}、10 ng・ μL^{-1}、50 ng・μL^{-1} 浓度下扩增的效果较差，0.1~2 ng・μL^{-1} 浓度范围内差异不明显。经多次重复试验，在 0.5 ng・μL^{-1} 浓度时条带较清晰、稳定。

chinaXiv:202003.00023v1



注: DNA 浓度为 0.01、0.05、0.1、0.25、0.5、2、10、50 ng • μL^{-1}。

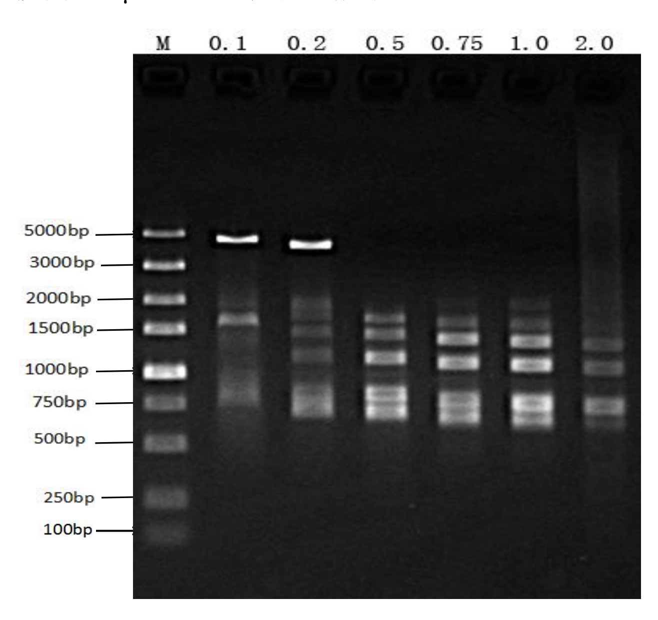
Note: DNA concentrations are 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 2, 10, 50 ng • μL^{-1}, respectively.

图 2 模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 2 Effects of template DNA concentration on ISSR-PCR reaction

2.2.2 引物浓度对 PCR 反应的影响

引物浓度在 0.1~2.0 μM •L^{-1} 范围内均能扩增出条带，但在 0.1 μM •L^{-1}、0.2 μM •L^{-1} 和 2.0 μM •L^{-1} 浓度下扩增的条带较少、亮度低，浓度在 0.5~1.0 μM • L^{-1} 时扩增效果较好，经反复试验，最终确定后续试验所用引物浓度为 0.5 μM • L^{-1}，如图 3 所示。



注: 引物浓度为 0.1、0.2、0.5、0.75、1.0、2.0 ng • μL^{-1}。

Note: Primer concentrations are 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 ng • μL^{-1}, respectively.

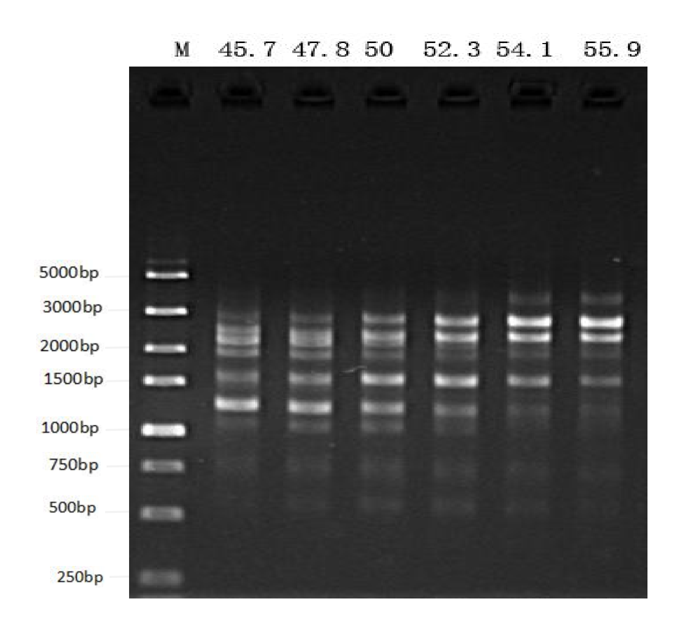
chinaXiv:202003.00023v1

图 3 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 3 Effects of primer concentration on ISSR-PCR reaction

2.2.3 退火温度对 PCR 反应的影响

本研究在最佳反应体系基础上对筛选出的 11 个引物进行退火试验，确定了每个引物的最佳退火温度，引物 UBC813、UBC814、UBC815、UBC823、UBC824、UBC835、UBC840、UBC841、UBC843、UBC844 和 UBC876 的最佳退火温度分别为 52.3 ℃、55.9 ℃、54.3 ℃、54.3 ℃、53.6 ℃、56.2 ℃、56.2 ℃、51.9 ℃、54.4 ℃、54 ℃和 50 ℃。部分引物筛选退火温度电泳图如图 4、图 5 和图 6 所示。



注：退火温度 45.7、47.8、50、52.3、54.、55.9 ℃。

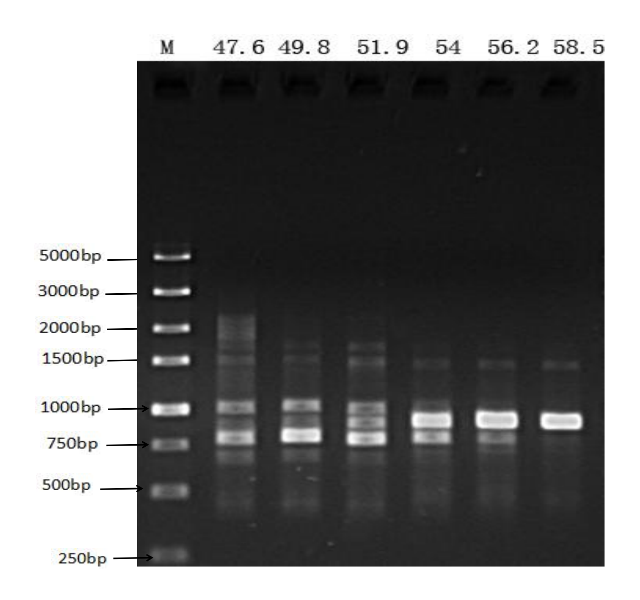
Note: Annealing temperatures are 45.7, 47.8, 50, 52.3, 54.1, 55.9 ℃, respectively.

图 4 引物 UBC813 不同的退火温度对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 4 Effect of annealing temperature of primer UBC813 on ISSR-PCR reaction

chinaXiv:202003.00023v1

chinaXiv:202003.00023v1

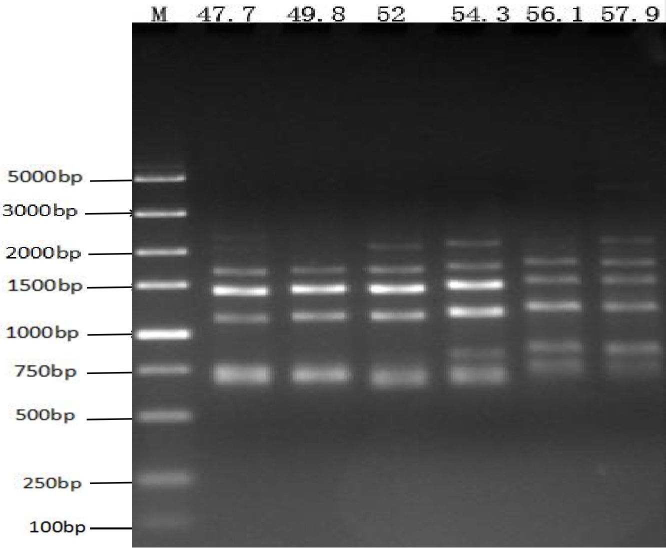


注： 退火温度为 47.6、49.8、52、54.3、56.1 和 57.9 ℃。

Note: Annealing temperatures are 47.6, 49.8, 52, 54.3, 56.1, 57.9 ℃, respectively.

图 5 引物 UBC841 不同的退火温度对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 5 Effect of annealing temperature of primer UBC841 on ISSR-PCR reaction



注： 退火温度为 47.7、49.8、52、54.3、56.1、57.9 ℃。

Note: Annealing temperatures are 47.7, 49.8, 52, 54.3, 56.1, 57.9 ℃, respectively.

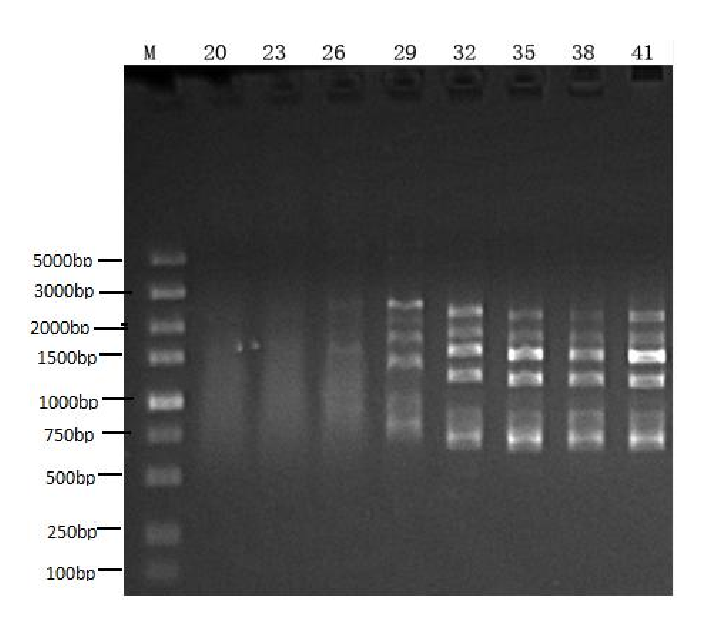
图 6 引物 UBC815 不同的退火温度对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 6 Effect of annealing temperature of primer UBC815 on ISSR-PCR reaction

2.2.4 循环次数对 PCR 反应的影响

增加循环数在一定程度上能够提高产物量，但反应时间过长会使非特异扩增产物增加，而且会受到各反应成分的用量限制，如：随着酶的扩增能力下降，合成目标片段的能力也随之下降，因此，适宜的循环次数对于扩增效果至关重要。

不同循环次数下的 ISSR-PCR 扩增结果如图 7 所示，模板在 20~26 个循环时均未扩增出条带，29~41 个循环时均能扩增出条带，但在 32 个循环时可获得明亮清晰的条带，效果最好，如果再增加循环次数，条带变化不大，但从节约时间和成本考虑，以 32 个循环为宜。



注: 循环数为 20、23、26、29、32、35、38、41。

Note: Cycles are 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, respectively.

图 7 不同循环数对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 7 Effect of cycle number on ISSR-PCR reaction

chinaXiv:202003.00023v1

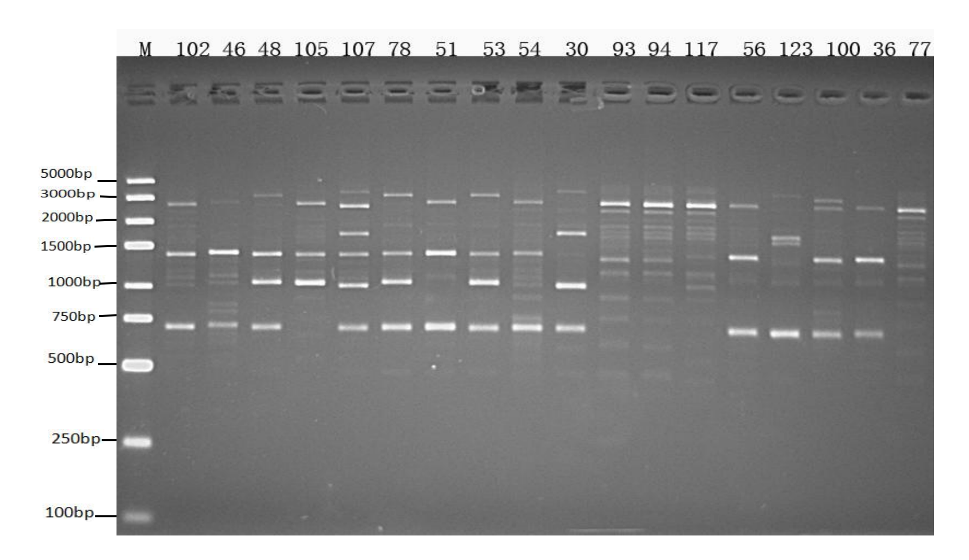
2.3 ISSR-PCR 体系稳定性检测

从毛叶叶子花(*Bougainvillea spectabilis*)品种、光叶叶子花(*Bougainvillea glabra*)品种、巴特叶子花(*Bougainvillea* × *buttiana*)品种、秘鲁叶子花(*Bougainvillea peruviana*)品种和拉丁名不详的品种(*Bougainvillea* sp.)中选出 18 个样品用于检测优化的 ISSR-PCR 反应体系，用引物 UBC824 对其进行扩增(图 8)，扩增结果显示本研究优化的叶子花 ISSR-PCR 反应体系稳定性好，条带清晰、重复性和多态性高，有丰富的特异性，可用于后续试验研究。

2.4 ISSR 引物筛选

本文对 100 个 ISSR 引物进行初筛、复筛，并确定最终筛选出的引物最佳退火温度，共筛选出 11 个扩增条带多、条带清晰、重复性好的 ISSR 引物，部分引物筛选结果如图 9、图 10 所示。

chinaXiv:202003.00023v1

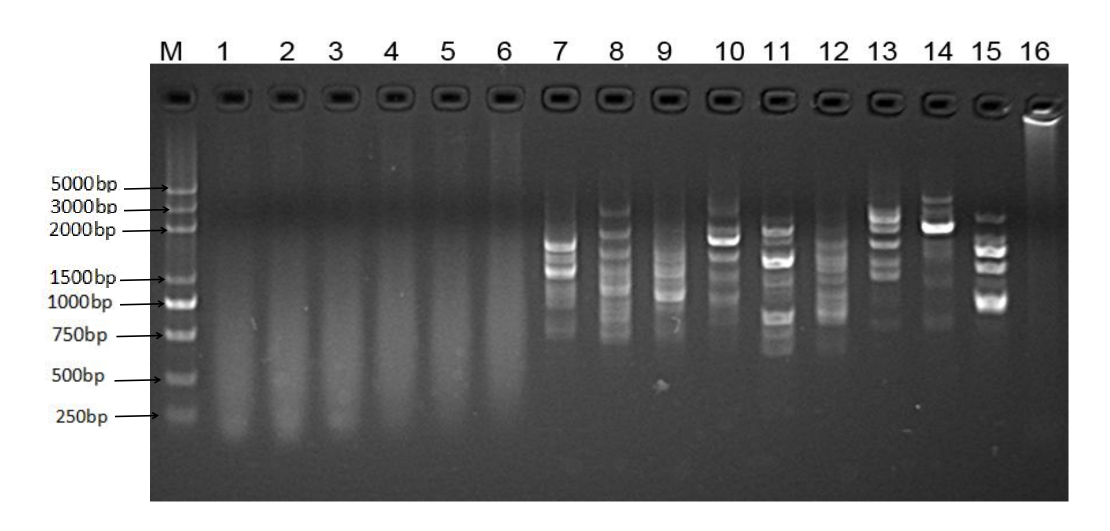


注：样品编号为 102、46、48、105、107、78、51、53、54、30、93、94、117、56、123、10、36 和 77。

Note: Sample numbers are 102, 46, 48, 105, 107, 78, 51, 53, 54, 30, 93, 94, 117, 56, 123, 10, 36 and 77, respectively.

图 8 18 份叶子花样品对 ISSR-PCR 反应体系的稳定性检测图

Fig. 8 The stability of ISSR-PCR reaction system in 18 samples of *Bougainvillea*

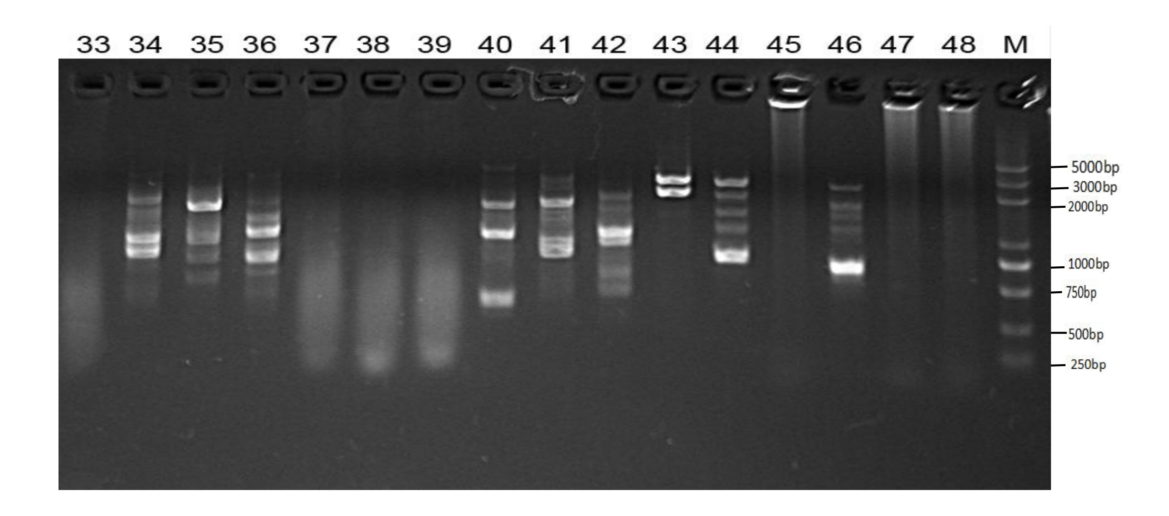


注①: M(Marker): 100-5000bp 标准分子量参照物; 注②: 引物编号 1-16: UBC801-UBC816

Note①: M(Marker): 100-5000bp molecular marker; Note②: Primer number1-16: UBC801-UBC816.

图 9 ISSR 引物筛选电泳图

Fig. 9 ISSR primer screening electrophoresis



注：引物编号 33-48: UBC833-UBC848。

Note: Primer number 33-48: UBC833-UBC848.

图 10　ISSR 引物筛选电泳图

Fig. 10　ISSR primer screening electrophoresis

2.5 叶子花种质资源 ISSR 分析

2.5.1 ISSR 引物多态性分析

从 100 个 ISSR 引物中筛选出 11 个扩增条带多、条带清晰、多态性高和重复性好的引物，对 131 个叶子花品种进行分析，结果见表 3。11 个引物共扩增 161 条带，平均每个引物扩增 14.6 条，其中有 156 条带具有多态性，多态性比率为 96.89%。11 个引物的扩增条带数在 12~20 之间，扩增条带数最多的是 UBC841(20 条)，UBC814、UBC815 和 UBC843 扩增的条带最少，均为 12 条。除引物 UBC823、UBC835 和 UBC840 之外，其余引物产生的多态性比例都达到 100%，说明这 11 条引物在供试材料中的多态性较好。引物 UBC815 对部分样品扩增的电泳图如图 11 所示。

表 3　ISSR 引物扩增条带统计结果

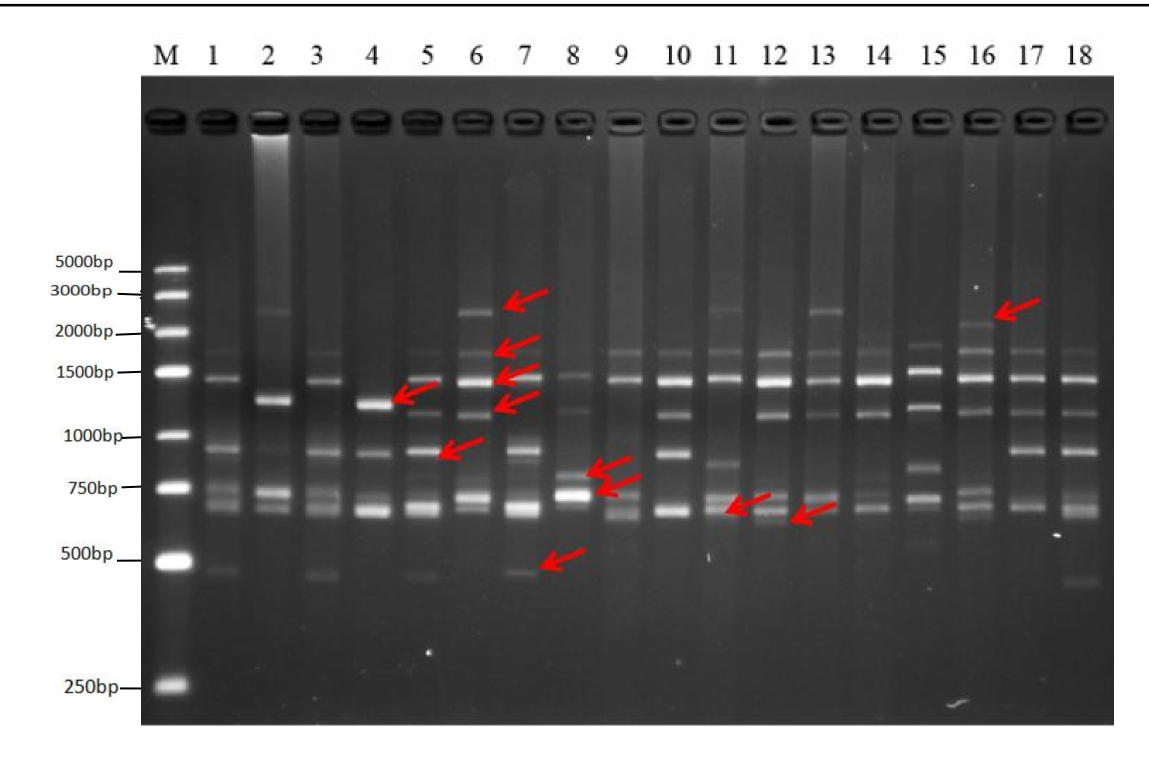
Table 3　Statistical results of ISSR primer amplification bands

ISSR 引物 ISSR primer	扩增条带数 Number of amplified alleles	多态条带数 Number of polymorphic alleles	多态位点百分数 Percentage of polymorphic loci
UBC813	16	16	100%
UBC814	12	12	100%

chinaXiv:202003.00023v1

ISSR 引物 ISSR primer	扩增条带数 Number of amplified alleles	多态条带数 Number of polymorphic alleles	多态位点百分数 Percentage of polymorphic loci
UBC815	12	12	100%
UBC823	14	12	85.7%
UBC824	16	16	100%
UBC835	15	13	86.7%
UBC840	15	14	93.3%
UBC841	20	20	100%
UBC843	12	12	100%
UBC844	14	14	100%
UBC876	15	15	100%
平均 Mean	14.6	14.2	96.9%

chinaXiv:202003.00023v1



注：样品编号为 1-18；红色箭头指向多态性条带。

Note: Sample numbers are 1-18; Red arrows point to polymorphic bands.

图 11　UBC815 引物扩增结果

Fig. 11　Amplication results of primer UBC815

2.5.2 叶子花种质资源的遗传多样性分析

将读取的数据转化为 0、1 矩阵，利用 Popgene32 软件分析相关遗传参数，分析结果见表 4。单个引物的等位基因数为 1.86~2.00，平均等位基因数 1.969；有效等位基因数为 1.33(UBC840)~1.68(UBC876)，平均有效等位基因数为 1.478；*Nei's* 基因多样性指数为 0.21(UBC840)~0.39(UBC841)，平均值为 0.294；*Shannon's* 信息指数为 0.34(UBC823、

UBC840)~0.57(UBC841)，平均值为 0.447。从 4 个遗传参数看，引物 UBC841 和 UBC876 的各项值均较其他引物高，引物 UBC840 的有效等位基因数、*Nei's* 基因多样性指数和 *Shannon's* 信息指数均为最低。由以上结果可知，叶子花的遗传多样性不够丰富。

表 4 11 个多态性 ISSR 引物基于 131 个品种的多态性参数

Table 4 Polymorphic parameters of 11 polymorphic ISSR primers based on 131 cultivars

ISSR 引物 ISSR primer	观测等位基因数 Number of alleles	有效等位基因数 Number of effective alleles	*Nei's* 基因多样性指数 Genetic diversity index	*Shannon's* 多样性指数 *Shannon's* information index
UBC813	2.00	1.49	0.29	0.45
UBC814	2.00	1.51	0.31	0.48
UBC815	2.00	1.47	0.28	0.42
UBC823	1.86	1.40	0.23	0.35
UBC824	2.00	1.39	0.25	0.40
UBC835	1.87	1.53	0.29	0.43
UBC840	1.93	1.33	0.21	0.34
UBC841	2.00	1.51	0.39	0.57
UBC843	2.00	1.49	0.30	0.46
UBC844	2.00	1.46	0.30	0.46
UBC876	2.00	1.68	0.38	0.56
均值 Mean	1.969	1.478	0.294	0.447

2.5.3 叶子花种质资源的 UPGMA 聚类分析

基于 11 个 ISSR 引物计算的叶子花 131 个品种间的遗传距离范围为 0.00~0.60，平均值为 0.365，利用 UPGMA 法对 131 个叶子花品种聚类分析，建立聚类分析树状图(图 15)，从聚类图可以看出，在遗传距离 0.58 处，131 个品种分为 6 大类群，即类群 1、类群 2、类群 3、类群 4、类群 5 和类群 6。

类群 1 包含 4 个种的 25 个品种，其中 13 个光叶叶子花、4 个毛叶叶子花、1 个巴特叶子花、1 个秘鲁叶子花、6 个拉丁名不详的品种。在遗传距离 0.54 处，类群 1 可再分为 3 个亚群，分别为亚群 1-Ⅰ、亚群 1-Ⅱ和亚群 1-Ⅲ。亚群 1-Ⅰ包括 8 个光叶叶子花品种(1 号、3 号、7 号、19 号、20 号、21 号、38 号和 39 号)、2 个毛叶叶子花品种(9 号和 11 号)、3 个拉丁名不详的品种(126 号、101 号和 127 号)，亚群 1-Ⅱ包括 3 个光叶叶子花品种(37 号、40 号和 41 号)、2 个毛叶叶子花品种(40 号和 84 号)、1 个巴特叶子花品种(51 号)、1 个秘鲁叶子花品种(76 号)、3 个拉丁名不详的品种(92 号、130 号和 131 号)，亚群 1-Ⅲ仅包括 2 个光叶叶子花品种(2 号和 4 号)。

类群 2 共包含 9 个品种，其中 5 个光叶叶子花品种(25 号、26 号、27 号、29 号和 28 号)、1 个巴特叶子花品种(45 号)、3 个拉丁名不详的品种(110 号、112 号和 111 号)。

类群 3 共包含 86 个品种，其中 6 个光叶叶子花品种、29 个巴特叶子花品种、6 个毛叶叶子花品种、9 个秘鲁叶子花品种、2 个光叶×毛叶杂交种(*B.* × *spectoglabra*)和 33 个拉丁名不详的品种。

chinaXiv:202003.00023v1

在遗传距离 0.56 处，类群 3 可再分为 4 个亚群，分别为亚群 3-Ⅰ、亚群 3-Ⅱ、亚群 3-III和亚群 3-Ⅳ。亚群 3-Ⅰ包括 2 个光叶叶子花品种(5 号和 6 号)、5 个巴特叶子花品种(18 号、17 号、14 号、15 号和 16 号)、2 个毛叶叶子花品种(8 号和 10 号)、2 个光叶×毛叶杂交种(13 号和 12 号)。亚群 3-Ⅱ仅有 1 个拉丁名不详的品种(86 号)。在遗传距离 0.53 处，亚群 3-III又可分为 3-IIIA、3-IIIB、3-IIIC、3-IIID、3-IIIE、3-IIIF 和 3-IIIG 七个小类，其中 3-IIIA 小类包括 1 个光叶叶子花品种(31 号)、2 个毛叶叶子花品种(81 号和 80 号)、1 个巴特叶子花品种(56 号)、8 个拉丁名不详的品种(97 号、118 号、119 号、120 号、116 号、96 号、95 号和 115 号)，3-IIIB 小类包括 1 个光叶叶子花品种(36 号)、1 个毛叶叶子花品种(82 号)、4 个巴特叶子花品种(58 号、59 号、60 号和 53 号)、3 个秘鲁叶子花品种(71 号、72 号和 75 号)、5 个拉丁名不详的品种(98 号、99 号、125 号、113 号和 122 号)，3-IIIC 小类包括 1 个光叶叶子花品种(23 号)、10 个巴特叶子花品种(47 号、49 号、50 号、42 号、43 号、48 号、55 号、57 号、44 号和 46 号)、3 个秘鲁叶子花品种(74 号、69 号和 70 号)、10 个拉丁名不详的品种(104 号、102 号、106 号、85 号、88 号、114 号、121 号、91 号、108 号和 107 号)，3-IIID 小类包括 7 个巴特叶子花品种(61 号、62 号、63 号、67 号、64 号、65 号和 66 号)、1 个秘鲁叶子花品种(77 号)、3 个拉丁名不详的品种(128 号、129 号和 109 号)，3-IIIE 小类包括 1 个秘鲁叶子花品种(73 号)和 1 个毛叶叶子花品种(78 号)，3-IIIF 小类包括 2 个拉丁名不详的品种(89 号和 90 号)，3-IIIG 小类包括 1 个巴特叶子花品种(54 号)和 3 个拉丁名不详的品种(93 号、117 号和 94 号)。亚群 3-Ⅳ包含 1 个光叶叶子花品种(24 号)、1 个巴特叶子花品种(52 号)、1 个秘鲁叶子花品种(68 号)和 2 个拉丁名不详的品种(87 号和 105 号)。

类群 4 包括 1 个光叶叶子花品种(30 号)和 1 个毛叶叶子花品种(79 号)。

类群 5 包括 1 个光叶叶子花品种(35 号)和 3 个拉丁名不详的品种(124 号、100 号和 123 号)。

类群 6 包括 4 个光叶叶子花品种(22 号、32 号、33 号和 34 号)和 1 个拉丁名不详的品种(103 号)。

根据聚类分析结果，131 个品种均被聚类分开，说明供试品种之间具有一定的遗传差异，ISSR 标记在叶子花种质资源分析和品种鉴定研究方面具有较好的效果。

chinaXiv:202003.00023v1

chinaXiv:202003.00023v1

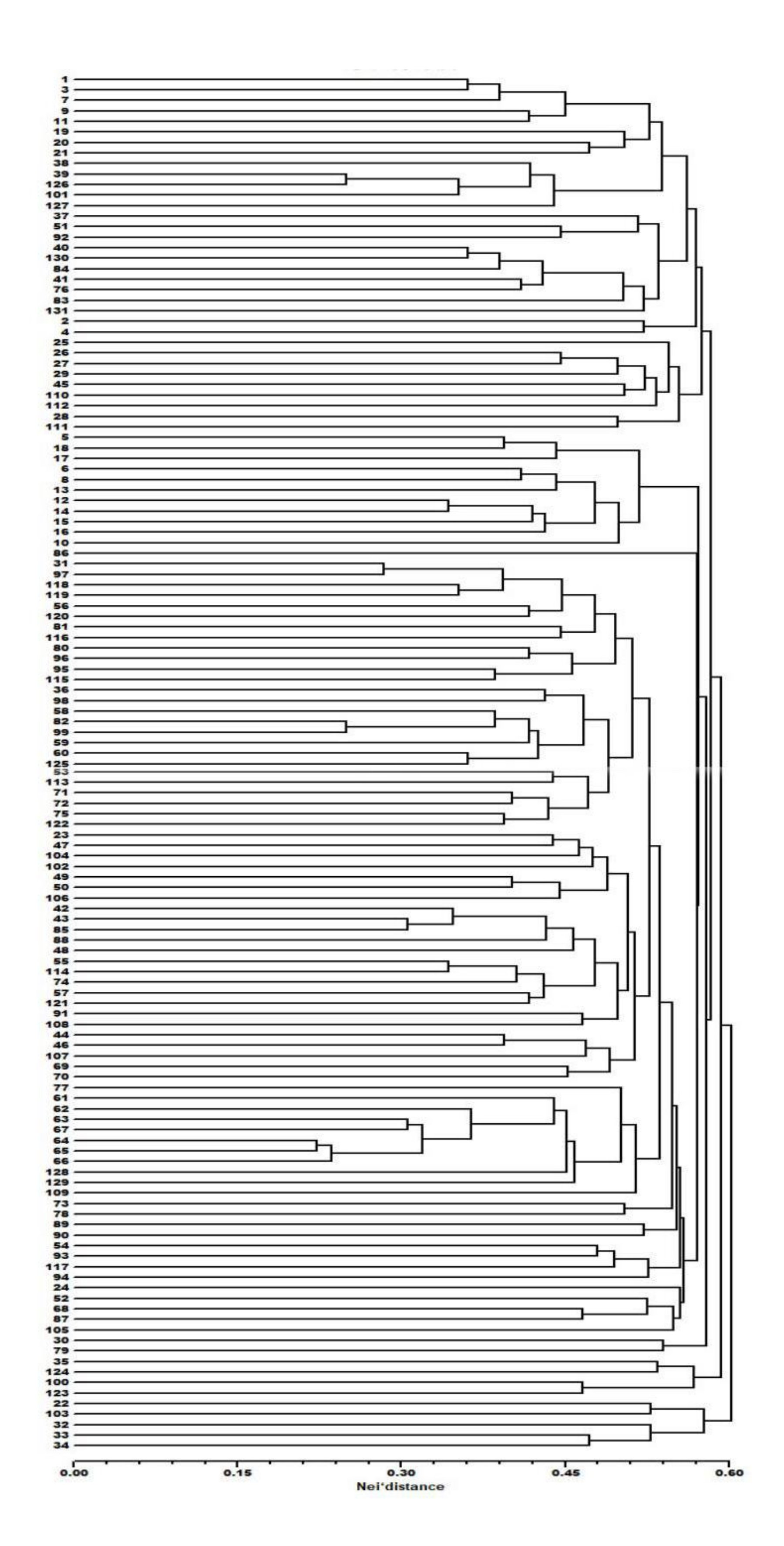


图 12　基于 ISSR 标记的 131 个叶子花品种的聚类图

Fig. 12　The dendrogram of 131 *Bougainvillea* cultivars based on ISSR markers

chinaXiv:202003.00023v1

2.5.4 叶子花种质资源的指纹图谱构建

利用筛选出的 11 个 ISSR 引物对 131 个叶子花品种扩增，可将 131 个样品完全区分开，对电泳条带进行统计，在同一位点处，有条带出现的标记为“1”，无条带出现的标记为“0”，用 0/1 数据矩阵构建 131 个叶子花品种的指纹图谱(表 5)，11 个引物中引物 UBC841 的鉴别率最高(80.92%)，可有效鉴别 106 个品种，再与引物 UBC876 结合可将 131 个叶子花品种完全鉴别开。引物 UBC841 共扩增出 20 个多态性位点，分别是：2500 bp、2200 bp、2000 bp、1600 bp、1500 bp、1450 bp、1100 bp、1000 bp、950 bp、850 bp、750 bp、700 bp、650 bp、550 bp、450 bp、400 bp、350 bp、150 bp、250 bp 和 2900 bp。引物 UBC876 共扩增出 15 个多态性位点，分别是：2800 bp、2500 bp、2000 bp、1800 bp、1500 bp、1350 bp、1150 bp、1050 bp、900 bp、850 bp、750 bp、650 bp、550bp、3100 bp 和 500bp。

引物 UBC876 构建了品种 12 号、14 号、31 号、39 号、42 号、43 号、44 号、48 号、58 号、64 号、65 号、66 号、67 号、70 号、82 号、85 号、86 号、88 号、90 号、97 号、98 号 99 号、101 号、107 号和 126 号的含有 15 位数字的指纹图谱，其余品种指纹图谱(含有 20 位数字)均由引物 UBC841 构建。

表 5　131 个叶子花品种 ISSR 特征指纹数据

Table 5　ISSR characteristic fingerprinting data of 131 *Bougainvillea* cultivars

品种序号 Cultivar no.	分子指纹 Molecular fingerprint	品种序号 Cultivar no.	分子指纹 Molecular fingerprint	品种序号 Cultivar no.	分子指纹 Molecular finger print
1	10111111000111110000	45	10111101111111110010	89	00111111111011110000
2	00010011001111111100	46	01111111111100110100	90	111111100010100
3	10111111000111100000	47	00111111111111101000	91	00011001111111111100
4	00011010000101000000	48	001111100000111	92	00110010010111100000
5	01011111110110111000	49	01011111111001011000	93	00101101111111111000
6	11011011111010110000	50	10011111111101110100	94	10101101111101111000
7	11111101101111100000	51	10111010010111100000	95	10101001111101111000
8	11011011111011100000	52	11011001011010111100	96	00101011111110011100
9	10011111101110100000	53	00000001110001110000	97	010101000110000
10	01011111111000100000	54	00010101111111110100	98	011111000101100
11	10111111101111010000	55	10011101111111111000	99	001111100001101
12	000110101000100	56	10011101111100110001	100	00110010000110111000
13	01011101111110110000	57	01111101111101111000	101	001111101001100
14	000110101101101	58	001101110011100	102	00011101111111111100
15	01111110111110110000	59	10110000111111110000	103	11111100101110111100
16	01111111110000110000	60	01011000111101111000	104	11111101111111111000
17	01011100111110110000	61	11001001110010111000	105	00001101111101110000
18	01011111110111000000	62	00011001111010101000	106	00011011111111110100
19	10011011011111100000	63	01011001111010000000	107	111111010111100
20	00011111101111100001	64	010111110101100	108	01111111111001111000

品种序号 Cultivar no.	分子指纹 Molecular fingerprint	品种序号 Cultivar no.	分子指纹 Molecular fingerprint	品种序号 Cultivar no.	分子指纹 Molecular finger print
21	11011101101111100001	65	010111100101000	109	01011001111101010100
22	11111101100111011100	66	010111100101100	110	10111101100111100101
23	10011011111111011100	67	001111100000110	111	10111101101101010100
24	00111101101001110000	68	10011001011111110001	112	00011001100011110100
25	10011011101111110100	69	11111011111111111000	113	00011011100101100100
26	10011001101111100100	70	010111111111000	114	11111111111001111000
27	11011011101011100100	71	11011001111111100000	115	10101011111101110100
28	10111001100111100100	72	01011001110101110000	116	11101111110011111000
29	00011111111111100100	73	11111101111110111000	117	00101001111111111100
30	00000000011101111000	74	10101101111101111000	118	10111011010010101000
31	010000100111000	75	11011000111011110000	119	10011011011011110000
32	01111000110011110000	76	01011001000010110000	120	10011111111111100000
33	01111001100011110000	77	01011001111010101000	121	10011101111111100000
34	01101000110000011000	78	10011111111101110000	122	11011001110111111000
35	00100000110001011000	79	11100101111101111001	123	01111010010011110000
36	11110000111100011000	80	10101101111100011001	124	00110000010001101000
37	10111100110011111000	81	00101001110011111000	125	00011000111100101000
38	10110001100000010000	82	001011100011100	126	000111101001000
39	000011101001000	83	11011001110010101000	127	00001001101010110000
40	01011001000110100000	84	00011011000110101000	128	01011001111010101000
41	01011000000110000000	85	011101110010100	129	01011001111010101000
42	011111011010100	86	001110010011000	130	01011011000110100000
43	011101010110100	87	00101101111111110000	131	01011101010100100000
44	111010111111100	88	001101101011100		

3 讨论与结论

3.1 ISSR 体系优化

DNA 模板量对 PCR 扩增起着关键作用，本研究 DNA 模板浓度在 0.01~50 ng・μL-1 范围内均能扩增出条带，但浓度过高或过低扩增的条带不清晰、弥散(王渭霞，2010)，经反复试验，确定 0.5 ng・μL^{-1} 为最佳浓度，此浓度下扩增的条带最清晰、稳定。引物浓度直接影响 PCR 扩增结果，过高会增加错配和非特异性扩增的几率，且易使引物之间形成二聚体，浓度过低易导致扩增产物不足，影响扩增效果(刘昕，2014)。PCR 特异性亦受退火温度的影响，而碱基组成及其浓度、引物长度和靶基序列长度都影响退火温度，因此不同的引物其退火温度不一样(张茹，2014)，本研究通过梯度试验，筛选出每个引物的最适退火温度。循环次数对 PCR 扩增具有决定性的影响，循环次数越多，产生非特异性产物的量也越多，一般控制在 30~40 次之间(冯富娟等，2004)，本研究在 32 个循环时可获得明亮清晰的条带，效果最好。

3.2 ISSR 标记分析叶子花种质资源遗传多样性与亲缘关系

chinaXiv:202003.00023v1

本研究在优化的 ISSR-PCR 反应体系的基础上，基于 11 个多态性高、重复性好和稳定性强的 ISSR 引物对 131 个叶子花品种进行扩增，共扩增出 161 条带，其中有 156 条谱带具有多态性，多态性比率为 96.7%，较 RAPD(多态性比率 67.4%)(Richa et al，2009)和同工酶(多态性比率 75.5%)具有更为丰富的多态性(尹俊梅等，2001)。供试的叶子花 *Nei's* 基因多样性指数(均值 0.29)和 *Shannon's* 信息指数(均值 0.45)都较低，并且遗传相似系数高(0.64~0.95)，这些数据均表明供试品种的遗传多样性不高，这一结果同黄彦晶(68 份叶子花的遗传相似系数为 0.50~0.97)(黄彦晶，2010)和 Richa(30 份叶子花的遗传相似系数为 0.51~0.94)等的研究结果相一致。叶子花遗传多样性不高的原因可能是：叶子花特殊的花器官构造以及花粉活力低使其杂交育种受到限制，导致无性繁殖成其主要繁殖方式，而长期的无性繁殖使得叶子花的基因池变窄，遗传相似性较高，亲缘关系较近(黄彦晶，2010)。

供试叶子花品种间的遗传距离为 0.00~0.60，平均 0.365，聚类分析中 131 个叶子花品种均可有效鉴定，表明 ISSR 对叶子花品种鉴定具有较高的可靠性。通过聚类，在遗传距离 0.58 处，将所有叶子花品种聚为 6 大类，说明供试品种间存在差异，并且聚类呈现一定规律，如：每个种的大部分品种聚在一类，如光叶叶子花 30 个品种中 18 个(60.0%)聚在类群 1 和类群 2(类群 1 和类群 2 属于一大类，二者在遗传距离 0.56 处被分成两个类群)，巴特叶子花 31 个品种中 29 个(93.5%)聚在类群 3，秘鲁叶子花 11 个品种中 9 个(81.8%)聚在类群 3，2 个杂交种 12 号和 13 号聚在亚群 3-Ⅰ。但是，同一个种仍有品种未聚在一类或亚类，如光叶叶子花品种绿叶浅紫和雪紫分别聚在类群 4 和类群 5，白雪公主、小叶紫、新加坡白和新加坡粉聚在类群 6，与其主要聚类的类群 1 和类群 2 分开聚类；1 个巴特叶子花品种(金边叶重粉)聚在了类群 1，而巴特叶子花是光叶叶子花和秘鲁叶子花的杂交种，该品种在扩增中表现出光叶叶子花品种的特征，所以和光叶叶子花品种聚在一起。此外，也有多个种的品种聚在一类，如类群 3 包含了所有的种和杂种，可能原因是这些品种长期生活在相似的环境下使其很多习性、性状乃至控制表型的基因逐渐趋于一致。

与李房英等(2011)基于 ISSR 的 68 个品种的聚类结果比较，品种名相同的 16 个品种聚类关系相似，如光叶斑叶紫花、大花深紫、黄金叶和胭脂红聚在亚群 1-Ⅰ(李房英等的品种依次为光叶斑叶紫花、黄金叶、小叶紫花和青叶白，聚为 A 类)，皱叶深红、樱花、水红、塔紫、金心和斑叶塔紫聚在亚群 3-Ⅰ(李房英等品种依次为皱叶深红、塔橙、重瓣白里透红、塔紫、金心宝巾和斑叶塔紫，聚为 B 类)。但是，基于 ISSR 分子标记的聚类结果与传统的依据形态分类的结果并不严格一致，如 30 号绿叶浅紫属于光叶叶子花，79 号毛叶属于毛叶叶子花，二者形态差异明显，并且分别属于不同的种，而在此聚类中二者却被聚为一类，表明分子标记检测结果与传统的表型分类仍存在一定差别。

通过本研究，一方面确定了叶子花品种间的亲缘关系，另一方面成功地建立了叶子花的分子指纹，为今后叶子花种质资源保存和品种鉴定提供了有用的信息。

参考文献

chinaXiv:202003.00023v1

JEDRZEJCZYK I, REWERS M, 2018. Genome size and ISSR markers for *Mentha* L. (Lamiaceae) genetic diversity assessment and species identification[J]. Ind Crop Prod, 120: 171-179.

MONERUZZAMAN K M, HOSSAIN ABMS, NORMANIZA O, et al., 2010. Effects of removal of young leaves and kinetin on inflorescence development and bract enlargement of *Bougainvillea glabra* var. “Elizabeth Angus”[J]. Aust J Crop Sci, 4(7): 467-473.

REZA RAJI M R, LOTFI M, TOHIDFAR M, et al., 2018. Somatic embryogenesis of muskmelon (*Cucumis melo* L.) and genetic stability assessment of regenerants using flow cytometry and ISSR markers[J]. Protoplasma, 255(3): 873-883.

RICHA S, SUDHIR S, ARVIND S, et al., 2009. RAPD-based genetic relationships in different *Bougainvillea* cultivars. Crop Breed Appl Biot, 9: 154-163.

ALI QS, 2015. Identification and diversity analysis of Wintersweet (*Chimonanthus Praecox*) crossing progenies using SSR molecular markers[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [ALi QS, 2015. 蜡梅的杂交 F1 代真实性鉴定及遗传多样性分析[D]. 武汉: 华中农业大学.]

FENG FJ, WANG FY, LIU T, 2004. The influence factors of the ISSR-PCR experiment system on *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc[J]. Chin Bull Bot, 21(3): 326-331. [冯富娟, 王凤友, 刘彤, 2004. 红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素[J]. 植物学通报, 21(3): 326-331.]

GUAN J, JIAO XH, WU JX, et al., 2013. Identification of Asian lily hybrid F1 by using ISSR[J]. Mol Plant Breed, 11(3): 415-420. [管洁, 焦雪辉, 吴锦娣, 等, 2013. 用 ISSR 分子标记鉴定亚洲百合杂种 F1 代. 分子植物育种[J]. 11(3): 415-420.]

HUANG YJ, 2010. ISSR analysis of germplasm resources of *Bougainvillea Brasiliensis* Raeusch[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture & Forestry University. [黄彦晶, 2010. 三角梅(*Bougainvillea Brasiliensis* Raeusch.)种质资源的 ISSR 分析[D]. 福州: 福建农林大学.]

LI FY, HUANG YJ, WU SH, et al., 2011. ISSR analysis of germplasm resources of *Bougainvillea* spectabilis Willd[J]. Chin J Trop Crops, 32(9): 1692-1696.[李房英, 黄彦晶, 吴少华, 等, 2011. 三角梅种质资源的 ISSR 分析[J]. 热带作物学报, 32(9): 1692-1696.]

LI GS, 2014. The research of ISSR on relationship of 5 species of wild *Camellia* of genus *Camellia* and fingerprint construction[D]. Changsha: Central South University of Forestry & Tecthology. [李国帅, 2014. 5 种山茶属野生油茶 ISSR 亲缘关系研究及指纹图谱的构建[D]. 长沙: 中南林业科技大学.]

LIANG Y, 2018. Genetic diversity analysis of *Caragana* Fabr. in inner Mongolia desert area[D]. Huhehaote: Inner Mongolia University. [梁颖, 2018. 内蒙古荒漠区锦鸡儿遗传多样性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学.]

SHAO ZT, 2017. Studies on genetic relationship of culinary *Rhubarb* and official *Rheum* based on ISSR and SRAP markers[D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology. [邵珠田, 2017. 利用 ISSR 及 SRAP 分子标记研究菜用大黄与药用大黄的亲缘关系[D]. 新乡: 河南科技学院.]

SUN LN, LIN M, LI JH, et al., 2017. Callus induction of *Bougainvillea* spectabilis cultivars[J]. J W Chin For Sci, 46(2): 157-160. [孙利娜, 林茂, 李进华, 等, 2017. 不同品种叶子花愈伤组织的诱导[J]. 西部林业科学, 46(2): 157-160.]

SUN LN, LIN M, WANG HX, et al., 2017. Identification of *Bougainvillea* spectabilis radiation mutant based on ISSR markers[J]. Guangxi For Sci, 46(3): 276-279.[孙利娜, 唐庆, 王华新, 等, 2017. 运用 ISSR 标记鉴定叶子花辐射突变体[J]. 广西林业科学, 46(3): 276-279.]

SUN LN, WANG HX, GONG JY, et al., 2013. Cutting propagation of *Bougainvillea glabra* and its effecting fac

chinaXiv:202003.00023v1

tors[J]. Guangxi For Sci, 42(2): 183-185.[孙利娜, 王华新, 龚建英, 等, 2013. 叶子花扦插育苗影响因素分析[J]. 广西林业科学, 42(2): 183-185.]

TAN HQ, 2014. Genetic diversity analysis and varietal idengtification among 68 Chinese asparagus bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedialis*) cultivars based on RAPD, ISSR and morphological markers[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University. [谭华强, 2014. 利用形态学和 RAPD、ISSR 分子标记分析 68 个豇豆品种的亲缘关系[D]. 雅安: 四川农业大学.]

WANG L, 2015. Analysis on genetic diversity of *Forsythia suspensa* by ISSR marker[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University. [王琳, 2015. 基于 ISSR 的连翘遗传多样性研究[D]. 太远: 山西农业大学.]

WANG LJ, 2016. A study on the genetic diversity and the identification of DNA barcoding of medicinal plants *Rosa* L. [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University. [王璐静, 2016. 蔷薇属(*Rosa* L.)药用植物的遗传多样性及 DNA 条形码鉴定研究[D]. 郑州: 河南农业大学.]

QANG WX, LAI FX, HONG LY, et al., 2010. Effects of DNA concentrations and storage conditions on PCR detection of transgenic rice [J]. J Agric Biotechnol, 18(5): 846-852. [王渭霞, 赖凤香, 洪利英, 等, 2010. 转基因水稻 DNA 样品浓度以及存放条件对 PCR 定性检测的影响[J]. 农业生物技术学报, 18(5): 846-852.]

YIN JM, OU WJ, ZHANG X, 2001. Protein analysis of genetic relationship of *Bougainvillea* cultivars[J]. Chin J Trop Crops, 22(4): 61-66. [尹俊梅, 欧文军, 张欣, 2001. 三角梅品种间亲缘关系的蛋白质分析[J]. 热带作物学报, 22(4): 61-66.]

ZHANG R, 2014. Analysis on genetic diversity of Radix *Astragali* by ISSR marker [D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University. [张茹, 2014. 药用黄芪 ISSR 遗传多样性分析[D]. 太远: 山西农业大学.]

ZHOU LY, 2014. ISSR analysis on the diversityof oil-tea Camellia germplasm[D]. Changsha: Hunan Normal University. [周兰英, 2014. 油茶种质资源多样性的分析[D]. 长沙: 湖南师范大学.]

ZHOU Q, 2008. Research on germplasm resource and propagational technique of *Bougainvillea* L. in China [J]. Chin Agric Sci Bull, 24(12): 321-324. [周群, 2008. 中国叶子花属植物种质资源及其繁殖技术研究[J]. 中国农学通报, 24(12): 321-324.]

chinaXiv:202003.00023v1